

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年5月27日 (27.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/044193 A1

(51) 国際特許分類: C12N 9/02, 15/53, C12Q 1/26

洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内 Fukui (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014423

(22) 国際出願日: 2003年11月13日 (13.11.2003)

(74) 代理人: 三枝 英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修町1-7-1 北浜 T N Kビル Osaka (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-329427
2002年11月13日 (13.11.2002) JP
特願2002-329428
2002年11月13日 (13.11.2002) JP
特願2003-33641 2003年2月12日 (12.02.2003) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東洋紡績株式会社 (TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒530-8230 大阪府 大阪市 北区堂島浜二丁目2番8号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 岸本 高英 (KISHI-MOTO, Takahide) [JP/JP]; 〒914-0047 福井県 敦賀市 東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内 Fukui (JP). 曾我部 敦 (SOGABE, Atsushi) [JP/JP]; 〒914-0047 福井県 敦賀市 東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内 Fukui (JP). 岡正則 (OKA, Masanori) [JP/JP]; 〒914-0047 福井県 敦賀市 東

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MODIFIED SARCOSINE OXIDASE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND REAGENT COMPOSITION USING THE SAME

(54) 発明の名称: 改変型ザルコシンオキシダーゼ、その製造法およびそれを用いた試薬組成物

(57) Abstract: A protein having been modified by addition, deletion, insertion or substitution of at least one amino acid in an amino acid sequence constituting a protein having a sarcosine oxidase activity and still having the sarcosine oxidase activity, characterized by having an improved stability in the state of a liquid compared with the unmodified one and/or having a lowered action on L-proline compared with the unmodified one. A sarcosine oxidase having at least one of the following characteristics, i.e., an action on L-proline being 0.7% or less based on sarcosine and a Km value to L-proline being 150 mM or more, when measured at 37°C and pH 8.0; a process for producing sarcosine oxidase having an excellent substrate specificity which comprises culturing a microorganism capable of producing sarcosine oxidase and collecting the sarcosine oxidase from the culture medium; and a reagent for measuring creatinine which contains the sarcosine oxidase.

(57) 要約: 本発明は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変換した蛋白質であって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有し、液状での安定性が変換前に比べて向上していること及び/又はL-プロリンに対する作用性が変換前に比べて低下していることを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼに関する。また、本発明は、37°C、pH8.0の測定条件下で、L-プロリンに対する作用性: ザルコシン対して0.7%以下、L-プロリンに対するKm値: 150mM以上、の少なくともいずれか一方の特性を有するザルコシンオキシダーゼ、該ザルコシンオキシダーゼの生産能を有する微生物を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取する基質特異性に優れたザルコシンオキシダーゼの製造法、該ザルコシンオキシダーゼを含むクレアチニン測定用試薬に関する。

WO 2004/044193 A1

明細書

改変型ザルコシンオキシダーゼ、その製造法およびそれを用いた試薬組成物

技術分野

本発明は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白工学的手法により改変することにより得られる、液状での安定性が向上し、基質特異性に優れ及び／又はプロリンに対する作用性が低減したザルコシンオキシダーゼ、その製造法およびそれを用いた試薬組成物に関する。

背景技術

ザルコシンオキシダーゼ (EC 1.5.3.1) は、臨床的に筋疾患、腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチン、クレアチニンの測定用酵素として、他の酵素、例えばクレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、ペルオキシダーゼと共に使用されている。ザルコシンオキシダーゼは基質であるザルコシンに水、酸素の存在下で作用して、グリシン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

このようなザルコシンオキシダーゼは、バチルス属 (特開昭54-52789号公報、特開昭61-162174号公報)、コリネバクテリウム属 (J. Biochem. 89, 599 (1981))、シリンドロカルボン属 (特開昭56-92790号公報)、シュードモナス属 (特開昭60-43379号公報)、アースロバクター属 (特開平2-265478号公報) 等の細菌が生産することが知られている。また、これら生産菌のザルコシンオキシダーゼ遺伝子を、遺伝子工学的手法により、大腸菌等の宿主を用いた大量生産する技術についても報告されている (特開平5-115281号公報、特開平6-113840号公報、特開平8-238087号公報)。

近年の臨床診断試薬の液状化に伴い、試薬成分の液状での安定化法が種々検討されているが、クレアチニンやクレアチン測定試薬に用いられるザルコシンオキシダーゼについても液状での安定性に優れたものが望まれている。我々のグループは、以前に野生型ザルコシンオキシダーゼを蛋白質工学的に改変し、金属イオンに対して安定性の向上した変異型ザルコシンオキシダーゼを報告した (例えば、特開平7-163341号公報参照。) が、診断薬試薬中での長期保存安定性については更なる改良が期待されている。

さらに、従来のザルコシンオキシダーゼは血中に存在するアミノ酸の1種であるプロリンに対しても作用することが知られており、クレアチニン、クレアチンの測定の際に正誤差を生じる原因となり得ることが指摘されている（臨床化学、20, 144-152（1991）、生物試料分析、17, 332-337（1994））。この問題を解消するために、我々のグループは野生型ザルコシンオキシダーゼを蛋白質工学的に改変し、プロリンに対する作用性を低下させたザルコシンオキシダーゼ（特開平10-248572号公報）を報告したが、本来の基質であるザルコシンに対する作用性等については不明であり、更なる改良が望まれていた。

- 10 本発明は、液状での安定性が向上した改変型ザルコシンオキシダーゼを提供することを目的とする。

本発明は、プロリンに対する反応性の小さい、基質特異性に優れたザルコシンオキシダーゼを提供することを目的とする。

- 15 本発明は、プロリンに対する作用性が低下したザルコシンオキシダーゼを提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討した結果、ザルコシンに対する作用性を損なわずに、液状での安定性が向上した、或いはプロリンに対する作用性が低下した改変型ザルコシンオキシダーゼを造成できることを見出した。

- 20 さらに、本発明者らは、ザルコシンに対する高い親和性を保持し、且つプロリンに対する作用性に小さいザルコシンオキシダーゼを造成できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下のような構成から成る。

- 25 項1. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変換した蛋白質であって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有し、液状での安定性が変換前に比べて向上していることを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項2. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換していることを特徴とする項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項3. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列番号1に記載されるアミノ酸配列と50%以上の相同性を有する、項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項4. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列番号1に記載されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有する、項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

10 項5. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有する、項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項6. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の155位~250位間に対応する部位の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

15 項7. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の82位~92位、または、354位~366位間に対応する部位の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項8. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の89位、155位、166位、204位、213位、233位、240位、250位、364位に対応する部位
20 からの群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項9. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の89位のリジンがアルギニンに置換されていることを特徴とする項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項10. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の155位のシステインがイ
25 ソロイシンに置換されていることを特徴とする項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項11. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の166位のアスパラギンがリジンに置換されていることを特徴とする項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 1 2. 配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 2 0 4 位のメチオニンがアラニンに置換されていることを特徴とする項 1 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 1 3. 配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 2 1 3 位のセリンがプロリンに置換されていることを特徴とする項 1 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 1 4. 配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 2 3 3 位のシステインがセリンに置換されていることを特徴とする項 1 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 1 5. 配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 2 4 0 位のアスパラギンがチロシンに置換されていることを特徴とする項 1 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 1 6. 配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 2 5 0 位のグルタミン酸がグルタミンに置換されていることを特徴とする項 1 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

15 項 1 7. 配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 3 6 4 位のアラニンがバリンに置換されていることを特徴とする項 1 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 1 8. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも 1 個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変換した蛋白質であって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有し、且つレuproリンに対する作用性が変換前に比べて低下していることを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 1 9. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも 1 個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換していることを特徴とする項 1 8 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

25 項 2 0. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列と 5 0 % 以上の相同性を有する、項 1 8 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 2 1. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有する、項 1 8 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 2 2. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列番号 1 に記載
5 されるアミノ酸配列を有する、項 1 8 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 2 3. 配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 8 2 位～1 5 2 位、2 1 6 位～3 2 8 位の間の少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする項 1 8 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 2 4. 配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 8 2 位～9 7 位、3 1 3 位
10 ～3 2 8 位の少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする項 1 8 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 2 5. 配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 8 9 位、9 4 位、3 2 2 位からなる群より選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする項 1 8 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

15 項 2 6. 配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 8 9 位のリジンがアルギニンに置換されていることを特徴とする項 1 8 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 2 7. 配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 9 4 位のバリンがグリシンに置換されていることを特徴とする項 1 8 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

20 項 2 8. 配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 3 2 2 位のリジンがアルギニンに置換されていることを特徴とする項 1 8 記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

項 2 9. 改変後のザルコシンに対する Km 値が、改変前に比べて 3 倍以内であることを特徴とする項 1 8 に記載されるザルコシンオキシダーゼ。

25 項 3 0. 改変後のザルコシンに対する Km 値が、改変前に比べて 1. 5 倍以内であることを特徴とする項 1 8 に記載されるザルコシンオキシダーゼ。

項 3 1. 3 7℃、pH 8. 0 の測定条件下で、下記の少なくとも 1 種の特性を有することを特徴とするザルコシンオキシダーゼ。

 L-プロリンに対する作用性：ザルコシン対して 0. 7 %以下

Ｌ－プロリンに対するKm値：150mM以上

項32. 37℃、pH8.0の測定条件下で、下記の少なくとも1種の特性を有することを特徴とする項31に記載のザルコシンオキシダーゼ。

Ｌ－プロリンに対する作用性：ザルコシン対して0.5%以下

5 Ｌ－プロリンに対するKm値：200mM以上

項33. ザルコシンに対するKm値が10mM以下である、項31記載のザルコシンオキシダーゼ。

項34. ザルコシンに対するKm値が5mM以下である、項31記載のザルコシンオキシダーゼ。

10 項35. 項1～17、18～30のいずれか1項に記載される改変型ザルコシンオキシダーゼをコードする遺伝子。

項36. 項35に記載の遺伝子を含むベクター。

項37. 項36に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

15 項38. 項37に記載の形質転換体を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼの製造法。

項39. 項31～34のいずれか1項に記載されるザルコシンオキシダーゼの生産能を有する微生物を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする基質特異性に優れたザルコシンオキシダーゼの製造法

20 項40. 項1～17、18～30、31～34のいずれか1項に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチン測定用試薬。

項41. 項1～17、18～30、31～34のいずれか1項に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチニン測定用試薬。

以下、本発明をより詳細に説明する。

25 本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは、臨床検査分野におけるクレアチン、クレアチニンの分析に有用である。

本願発明の一実施態様は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失挿入あるいは置換により変換した蛋白質であって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有し、液状での安

定性が変換前に比べて向上していること、プロリンに対する作用性が本来の基質であるザルコシンに比べて十分に小さいこと、或いはザルコシンオキシダーゼ活性を有し、且つL-プロリンに対する作用性が変換前に比べて低下していることを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼである。

- 5 プロリンに対する作用性は、ザルコシンを基質とした際の酵素活性に対する、L-プロリンを基質とした際の酵素活性の相対比（%）より求めることができる。本願発明のザルコシンオキシダーゼは、L-プロリンに対する作用性がザルコシンに対する作用性の0.7%以下、好ましくは0.5%以下である。

本願発明のもう1つの実施態様では、ザルコシンオキシダーゼは、プロリンに
10 対するKm値（ミカエリスーメンテナンズ定数）が高く、クレアチニンやクレアチン測定用試薬に適用した場合、検体中のプロリンの影響を受けにくい。本願発明のザルコシンオキシダーゼは、L-プロリンに対するKm値は150mM以上、好ましくは200mM以上である。

本願発明のもう1つの実施態様では、本発明のザルコシンオキシダーゼは、測
15 定試薬の必要添加量を抑えて、基質特異性の高さを活かすという観点から、ザルコシンに対するKm値は好ましくは10mM以下、更に好ましくは5mM以下である。

本発明のザルコシンオキシダーゼは、上記の性質を有するものであれば、特に
限定されるものではなく、例えば微生物や哺乳動物由来の酵素などを使用するこ
20 とができる。また、公知のザルコシンオキシダーゼを遺伝子工学、蛋白質工学的技術を用いて改変した酵素、化学修飾により特性を改良した酵素も含まれる。

本発明の1つの実施態様における改変型ザルコシンオキシダーゼは、液状での
安定性が改変前に比べて向上していることを特徴とする。本発明における液状で
の安定性とは、例えば適当な緩衝液中に該改変型酵素を溶解して、適当な温度で
25 一定期間保存した後の残存酵素活性の比率を意味する。

「適当な緩衝液」は、ザルコシンオキシダーゼの至適pHであるpH7～8付近で十分な緩衝能を持つよう、その種類と濃度を選べば特に限定されないが、好ましくは50mMのリン酸カリウム緩衝液（pH7.5）、または、50mMの

PIPES-NaOH緩衝液(pH7.5)が選択される。緩衝液には、さらに必要により界面活性剤、塩類、キレート剤、防腐剤などを含んでもよい。

「適当な温度で一定期間保存」の条件は特に限定されないが、好ましくは、液状診断薬試薬中での長期保存安定性を念頭に置いた加速(苛酷)試験の条件が選択される。具体的には、「40℃、3日間保存」、または、「60℃、30分間保存」などが挙げられる。時間が許せば、液状診断薬中が実際に長期保存される温度として汎用される2℃~10℃の冷蔵条件下で6ヶ月以上の保存を選択してもよい。

保存における、ザルコシンオキシダーゼの濃度は、特に限定されないが、通常の診断試薬に使用される濃度を想定した1~30U/mlが好ましく選択される。さらに好ましくは5~20U/mlである。

「安定性が改変前に比べて向上している」とは、一定期間保存後の活性保持率が、同条件で測定した改変前酵素の活性保持率と比べて高いことをいう。

本発明の一実施態様としては、50mMのリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)中で60℃、30分間保存した後の残存酵素活性率が、改変前に比べて向上した改変型ザルコシンオキシダーゼである。別な実施態様としては、2mMのEDTA、50mMのNaCl、0.1%(W/V)の2-メチルイソチアゾロン、0.1%(W/V)のトリトンX-100を含む50mMのPIPES-NaOH緩衝液(pH7.5)中で40℃、3日間保存した後の残存酵素活性率が、改変前に比べて向上した改変型ザルコシンオキシダーゼである。

本発明の一実施形態における改変型ザルコシンオキシダーゼは、プロリンに対する反応性が改変前に比べて低下していることを特徴とする。ここでプロリンに対する反応性とは、本来の基質であるザルコシンを基質とした際の酵素活性に対する、プロリンを基質とした際の酵素活性の相対比を意味する。そして、プロリンに対する反応性が低下していれば、ザルコシンを基質とした際の比活性は、変化していても本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼに包含される。また、本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼのザルコシンに対するKm値は変化することがあっても良いが、クレアチニンやクレアチンの測定試薬に適応する場合、反応性

の低下を引き起こす原因となるので、好ましくは改変前の3倍以内、更に好ましくは1.5倍以内である。

本発明の改変に使用するザルコシンオキシダーゼは特に限定されるものではなく、例えば公知のパチルス属やシュードモナス属、コリネバクテリウム属等に由来するザルコシンオキシダーゼを用いることができる。

本発明では一例として、アースロバクター・エスピーTE1826（微工研菌寄第10637号）のザルコシンオキシダーゼ（特開平2-265478号公報）を用いて、蛋白質工学的に改変した例を示す。

本発明者らのグループは、既に、アースロバクター・エスピーTE1826より抽出した染色体DNAよりザルコシンオキシダーゼ遺伝子の単離に成功し、そのDNAの全構造を決定し（Journal of Fermentation and Bioengineering Vol. 75 No. 4 pp239-244（1993）に記載）、本ザルコシンオキシダーゼを遺伝子工学的手法によって形質転換体に高生産させることに成功し、高純度なザルコシンオキシダーゼを安価に大量供給することを可能にしている（特開平6-113840号公報）。アースロバクター・エスピーTE1826のザルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列を、配列番号1に示す。また、これらのアミノ配列をコードするDNA配列を、配列番号2に示す。

但し、本発明は配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するザルコシンオキシダーゼを改変したものに限定されるものでなく、他のザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を改変したものであってもよい。他のザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質の好適な例として、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有するザルコシンオキシダーゼと立体構造が類似したザルコシンオキシダーゼ、具体的にはアミノ酸配列の相同性が50%以上である、更に好ましくはアミノ酸配列の相同性が80%以上である、他のザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が挙げられる。これはアミノ酸配列において50%乃至は80%以上の相同性を有し、同じ触媒活性を示す酵素蛋白質の場合、立体構造においても通常、類似性が高く、基質特異性に関与するアミノ酸残基や反応メカニズムが同じである場合が多いことを根拠とする。

また、本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは、本願発明の酵素特性の本質である酵素活性及び／又は安定性が損なわれない範囲で、更に１もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたものであっても良い。具体例には、ザルコシンオキシダーゼの精製を簡素化するためにアミノ酸配列のN末端側、又は
5 C末端側にヒスチジントグを付加したものが例示される（例えば、「実験医学」、2002年、20巻、p479-482）。

なお、本発明におけるアミノ酸配列の相同性は、公知の遺伝子解析ソフト（例えば、Genetyx-win(ver.3)、ソフトウェア開発（株））などを用いて求めることができる。ここで相同性とは比較対象とするアミノ酸配列と類似性を有する範囲
10 において、一致するアミノ酸残基のパーセンテージをいう。

本願発明の別の実施態様は、配列番号1に記載されるアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換していることを特徴とする、液状での安定性が変換前に比べて向上している改変型ザルコシンオキシダーゼである。

本願発明の別の実施態様は、配列番号1に記載されるアースロバクター・エスピーTE1826のアミノ酸配列の155位～250位、若しくは、アースロバクター・エスピーTE1826以外のザルコシンオキシダーゼにおいて配列番号
15 1に記載されるアミノ酸配列の155位～250位に対応する部位の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする、液状での安定性が変換前に比べて向上している改変型ザルコシンオキシダーゼである。

20 本願発明の別の実施態様は、配列番号1に記載されるアースロバクター・エスピーTE1826のアミノ酸配列の82位～92位、もしくは、アースロバクター・エスピーTE1826以外のザルコシンオキシダーゼにおいて配列番号1に記載されるアミノ酸配列の82位～92位に対応する部位の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする、液状での安定性が変
25 換前に比べて向上している改変型ザルコシンオキシダーゼである。

X線結晶解析により立体構造が明らかにされているザルコシンオキシダーゼの報告がある（例えば、「Structure」,1999年、7巻3号,p.331-345）。その報告によれば、該ザルコシンオキシダーゼは配列番号1に記載されるアミノ酸配列と相同性を有し、アースロバクター・エスピーTE1826のザルコシンオキシダ

一ゼのアミノ酸配列である配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 82 位～92 位、若しくは、アースロバクター・エスピーTE1826 以外のザルコシンオキシダーゼにおいて配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 82 位～92 位に対応する部位が、ザルコシンオキシダーゼの触媒ドメインと FAD 結合ドメインの連結部位を構成すると推察される。

本願発明の別の実施態様は、配列番号 1 に記載されるアースロバクター・エスピーTE1826 のアミノ酸配列の 364 位を含む α ヘリックスを構成すると推察される 354 位～366 位若しくはアースロバクター・エスピーTE1826 以外のザルコシンオキシダーゼにおいて配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 354 位～366 位に対応する部位の間の少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする液状での安定性が変換前に比べて向上している改変型ザルコシンオキシダーゼである。

好ましくは、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 89 位、155 位、166 位、204 位、213 位、233 位、240 位、250 位、364 位、若しくは他のザルコシンオキシダーゼの対応する部位からなる群より選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている改変型ザルコシンオキシダーゼである。

更に好ましくは、次の群より選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている改変型ザルコシンオキシダーゼである。配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列の 89 位のリジンがアルギニンに置換、155 位のシステインがイソロイシンに置換、166 位のアスパラギンがリジンに置換、204 位のメチオニンがアラニンに置換、213 位のセリンがプロリンに置換、233 位のシステインがセリンに置換、240 位のアスパラギンがチロシンに置換、250 位のグルタミン酸がグルタミンに置換、364 位のアラニンがバリンに置換された改変型ザルコシンオキシダーゼが例示される。

本願発明の別の実施態様は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列番号 1 に記載されるアミノ酸配列を有する改変型ザルコシンオキシダーゼである。

本願発明の別の実施態様は、ザルコシンオキシダーゼの触媒ドメイン、および触媒ドメインとFAD結合ドメインの連結部位を構成する領域の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている改変型ザルコシンオキシダーゼである。配列番号1に記載されるアミノ酸配列と相同性を有し、X線結晶解析により

5 立体構造が明らかにされているザルコシンオキシダーゼより、配列番号1に記載されるアミノ酸配列の82位～152位、216位～328位がザルコシンオキシダーゼの触媒ドメイン、および触媒ドメインとFAD結合ドメインの連結部位を構成すると推察される（例えば「Structure」, 1999年, 7巻3号, p.331-345）。

好ましくは、ザルコシンオキシダーゼの触媒ドメインとFAD結合ドメインの

10 連結部位、およびこれに近接する触媒ドメインの β シート構造を構成する領域の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている改変型ザルコシンオキシダーゼである。配列番号1に記載されるアミノ酸配列の82位～97位、313位～328位がザルコシンオキシダーゼの触媒ドメインとFAD結合ドメインの連結部位、およびこれに近接する触媒ドメインの β シート構造を構成すると

15 推察される（例えば、「Structure」, 1999年, 7巻3号, p.331-345）。

本願発明の別の実施態様は、配列番号1に記載されるアミノ酸配列の89位、94位、322位からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている改変型ザルコシンオキシダーゼである。

中でも好ましくは、配列番号1に記載されるアミノ酸配列の89位のリジンが

20 アルギニンに、94位のバリンがグリシンに、あるいは、322位のリジンがアルギニンに置換されている改変型ザルコシンオキシダーゼである。

本願発明の別の実施態様は、上記の改変型ザルコシンオキシダーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体、さらには、該形質転換体を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取

25 することを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼの製造法である。

本発明のザルコシンオキシダーゼの製造方法は特に限定されないが、公知の酵素を蛋白質工学的手法を用いて改良する場合、以下に示すような手順で製造することが可能である。ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変する手法が

用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作成される。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット（Transformer Mutagenesis Kit；

- 5 Clonetechn製、EX0111/Mung Bean Deletion Kit；Stratagene製、QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit；Stratagene製など）の使用、或いはポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）の利用が挙げられる。

作製された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAは、プラスミドと連結された状態にて宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体と

- 10 なる。この際のプラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリー

（*Escherichia coli*）を宿主微生物とする場合には pBluescript、pUC18 などを使用できる。宿主微生物としては、例えば、エシェリヒア・コリー W3110、エシェリヒア・コリー C600、エシェリヒア・コリー JM109、エシェリヒア・コリー DH5 α などが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例え
15 ば宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。更には、市販のコンピテントセル（例えば、コンピテントハイ JM109；東洋紡績製）を用いても良い。

- こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることによ
20 り、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養で行うが、工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュ
25 ークロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンな

が必要に応じて使用される。培養温度は菌が発育し、改変蛋白質を生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリーの場合、好ましくは20～42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変タンパク質が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を終了すればよく、通常は6～48時間程度である。培地pHは菌が発育し改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6.0～9.0程度である。

また、本発明のザルコシンオキシダーゼを野生型酵素として保有する微生物であれば、各微生物の生育に適した培養条件で、適当な栄養培地を用いて培養して採取することができる。この際、該酵素の発現を誘導させるために、培地中にザルコシンやクレアチン、ジメチルグリシンなどを適量添加することが望ましい。

培養物中の改変タンパク質を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般には常法に従って改変タンパク質が培養液中に存在する場合は、濾過、遠心分離などにより、改変タンパク質含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。改変タンパク質が菌体内に存在する場合には、得られた培養物から濾過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加して改変タンパク質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

この様にして得られた改変タンパク質含有溶液を、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。吸着剤或いはゲル濾過剤などによるゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーにより、精製された改変タンパク質を得ることができる。

本願発明の別の実施態様は、上記の改変型ザルコシンオキシダーゼを含むクレアチン測定用試薬、および、クレアチニン測定試薬である。本願発明のクレアチン測定用試薬、および、クレアチニン測定試薬は、液状安定性を向上させた、及び/又はレوپロリンに対する作用を低下させた改変型ザルコシンオキシダーゼ

を用いることにより、該試薬の有効期間の延長、或いは測定精度を向上させることができる。また、プロリンの影響度を7%未満、好ましくは5%未満に抑えることができる。

本発明のクレアチン測定試薬は、上記の液状での安定性が向上した、上記プロリンに対する基質特異性が小さい、或いは、上記プロリンに対する反応が低下した改変型ザルコシンオキシダーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼ、および過酸化水素検出試薬を含む。

また、クレアチニン測定試薬は、上記の液状での安定性が向上した、上記プロリンに対する基質特異性が小さい、或いは、上記プロリンに対する反応が低下した改変型ザルコシンオキシダーゼ、クレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、ペルオキシダーゼ、および過酸化水素検出試薬を含む。

過酸化水素検出試薬とは、ザルコシンオキシダーゼにより生成する過酸化水素をペルオキシダーゼの存在下で、生成色素として測定する試薬であり、酸化系発色試薬及び必要に応じて4-アミノアンチピリンや3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンなどのカップラーを含む。

本発明の過酸化水素測定試薬は、各種の市販のものなどを用いることができるが、特に限定されるものではない。更に上記のクレアチンまたはクレアチニン測定試薬は、金属塩、蛋白質、アミノ酸、糖類、有機酸などを安定化剤として使用することもできる。また通常、試薬性能に悪影響を及ぼさない範囲で防腐剤や界面活性剤を添加し、適当な緩衝液と共に使用される。緩衝液の種類、濃度およびpHは、各試薬成分の保存および酵素反応など目的に応じて一種もしくは複数が選択されるが、いずれの緩衝液を用いるに際しても、酵素反応時のpHとしては5.0～10.0の範囲で使用されることが好ましい。

本発明において、ザルコシンオキシダーゼ活性の測定は以下の条件で行う。

25 <試薬>

- 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) (200mM ザルコシンおよび0.1% トリトンX-100を含む)
- 0.1% 4-アミノアンチピリン
- 0.1% フェノール

25 U/ml ペルオキシダーゼ

<測定条件>

上記トリス塩酸緩衝液、4-アミノアンチピリン溶液、フェノール溶液、ペル
オキシダーゼ溶液を5:1:2:2の比率で混合し反応混液を調製する。反応混
5 液1mlを試験管に採り、37℃で約5分間中予備加温した後、酵素溶液0.0
5 mlを添加し、反応を開始させる。37℃で正確に10分間反応させた後、0.
25% SDS水溶液2.0mlを加えて反応を停止させ、この液の500nmの
吸光度を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下
同様の操作で吸光度を測定する。上記条件下で1分間に1マイクロモルの過酸化
10 水素を生成する酵素量を1単位とする。また、プロリンに対する反応性は、上記
試薬中のザルコシンを同じ濃度のL-プロリンに置き換えた場合の活性の相対比
として測定した。

本発明によって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を蛋白工学的手
法により改変し、液状安定性が改良された改変型ザルコシンオキシダーゼ、プロ
15 リンに対する作用性が低減した改変型ザルコシンオキシダーゼおよびL-プロリ
ンに対する作用性の小さい、基質特異性に優れたザルコシンオキシダーゼを供給
することが可能となった。本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼを、臨床的に
筋疾患、腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチン、クレアチニンの
測定用酵素として使用することで、共存物質（例えばプロリン）の影響を受け
20 ない、正確なクレアチン、クレアチニン測定が可能となり、該試薬の液状安定性
を向上させることができる。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。しかし、本発明はこれらに限
定されるものではない。

25 たとえば、後述の実施例3Aで示された13種類の改変型ザルコシンオキシダ
ーゼ、実施例3Bで示された9種類の改変型ザルコシンオキシダーゼのうち、S
AOM1は、配列表・配列番号1に記載されたアミノ酸配列の89位のリジンが
アルギニンに置換された変異体であり、SAOM2は、配列表・配列番号1に記
載されたアミノ酸配列の94位のバリンがグリシンに置換された変異体であるが、

該変異体の性能に実質的な影響を与えない範囲で、さらに、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されていてもさしつかえない。SAOM1とSAOM2以外の変異体についても同様である。

実施例1 ザルコシンオキシダーゼの発現プラスミドの構築

- 5 アースロバクター・エスピーTE1826由来ザルコシンオキシダーゼの発現プラスミドpSAOEP3は、特開平7-163341記載の方法に従って構築した。本発現プラスミドは、PUC18のマルチクローニングサイトに、TE1826のザルコシンオキシダーゼをコードする遺伝子を含む約1.7Kbpの挿入DNA断片を含む。その塩基配列を配列番号2に、また該塩基配列から推定されるザルコシンオキシダーゼアミノ酸配列を配列番号1に示す。

実施例2A 改変型ザルコシンオキシダーゼ遺伝子の作製

- ザルコシンオキシダーゼ遺伝子を含む発現プラスミドpSAOEP3と、配列番号3記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE製)を用いて、そのプロトコールに従って変異処理操作を行い、更に塩基配列を決定して、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM1A)を取得した。

- pSAOEP3と、配列番号4記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE製)を用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の155番目のシステインがイソロイシンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM2A)を取得した。

- 25 pSAOEP3と、配列番号5記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の166番目のアスパラギンがリジンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM3A)を取得した。

pSAOEP3と、配列番号6記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の204番目のメチオニンがアラニンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM4A)を取得した。

- pSAOEP3と、配列番号7記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の213番目のセリンがプロリンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM5A)を取得した。
- 10 pSAOEP3と、配列番号8記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の233番目のシステインがセリンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM6A)を取得した。
- 15 pSAOEP3と、配列番号9記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の240番目のアスパラギンがチロシンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM7A)を取得した。
- 20 pSAOEP3と、配列番号10記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の250番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM8A)を取得した。
- 25 pSAOEP3と、配列番号11記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の364番目のアラニンがバリンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM9A)を取得した。

pSAOM1Aと、配列番号7記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、213番目のセリンがプロリンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM10A)を取得した。

pSAOM10Aと、配列番号10記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、213番目のセリンがプロリン、250番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM11A)を取得した。

pSAOM11Aと、配列番号4、5、11記載の各合成オリゴヌクレオチドおよびこれらと相補的な各合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作の繰り返し、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、155番目のシステインがイソロイシン、166番目のアスパラギンがリジン、213番目のセリンがプロリン、250番目のグルタミン酸がグルタミン、364番目のアラニンがバリンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM12A)を取得した。

pSAOM11Aと、配列番号6、8、9記載の各合成オリゴヌクレオチドおよびこれらと相補的な各合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作の繰り返し、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、204番目のメチオニンがアラニン、213番目のセリンがプロリン、233番目のシステインがセリン、240番目のアスパラギンがチロシン、250番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM13A)を取得した。

25 実施例3A 改変型ザルコシンオキシダーゼの作製

pSAOM1A、pSAOM2A、pSAOM3A、pSAOM4A、pSAOM5A、pSAOM6A、pSAOM7A、pSAOM8A、pSAOM9A、pSAOM10A、pSAOM11A、pSAOM12A、pSAOM13Aの

各組み換えプラスミドでエシェリヒアコリーJM109のコンピテントセルを形質転換し、該形質転換体をそれぞれ取得した。

400mlのTerrific brothを2L容坂口フラスコに分注し、121℃、20分間オートクレーブを行い、放冷後別途無菌濾過したアンピシリンを100μl、5 /mlになるように添加した。この培地に100μl/mlのアンピシリンを含むLB培地で予め30℃、16時間培養したエシェリヒアコリーJM109(pSAOM1)の培養液を5ml接種し、30℃で20時間通気攪拌培養した。培養終了時のザルコシンオキシダーゼ活性は、前記活性測定において、培養液1ml当たり約9.5U/mlであった。

10 上記菌体を遠心分離により集菌し、20mMリン酸緩衝液(pH7.5)に懸濁した後、超音波処理により破碎し、更に遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。得られた粗酵素液をポリエチレンジアミンによる除核酸および硫酸分画を行い、20mMリン酸緩衝液(pH7.5)で透析した後、DEAEセファロースCL-6B(アマシャムバイオサイエンス製)、更に1時間の熱処理により
15 分離・精製し、精製酵素標品を得た。本方法により得られた標品は、SDS-PAGE的にほぼ単一のバンドを示した。また、この変異体をSAOM1Aと命名した。

pSAOM2A、pSAOM3A、pSAOM4A、pSAOM5A、pSAOM6A、pSAOM7A、pSAOM8A、pSAOM9A、pSAOM10
20 A、pSAOM11A、pSAOM12A、pSAOM13Aの各組み換えプラスミドによるエシェリヒアコリーJM109形質転換体についても上記方法と同様にして精製酵素標品を取得した。得られた酵素標品をそれぞれSAOM2A、SAOM3A、SAOM4A、SAOM5A、SAOM6A、SAOM7A、SAOM8A、SAOM9A、SAOM10A、SAOM11A、SAOM12A、
25 SAOM13Aと命名した。

比較例1 野生型ザルコシンオキシダーゼの作製

比較例として、pSAOEP3によるエシェリヒアコリーJM109形質転換体について、上記方法と同様にして、改変前の精製酵素標品を取得した。

実施例4A 改変型ザルコシンオキシダーゼの評価1

実施例 3 A で取得した変異型ザルコシンオキシダーゼ (SAOM1A、SAOM2A、SAOM3A、SAOM4A、SAOM5A、SAOM7A、SAOM8A) および比較例 1 で取得した各種ザルコシンオキシダーゼをそれぞれ、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 中に 5 U/ml になるように加え、60℃で30分間保存した後の残存酵素活性率 (%) を測定した。その結果を表 1 に示す。表 1 から判るように本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは改変前と比べて液状安定性が向上していることが確認された。

表 1

改変体	変異	活性残存率 (%)
SAOM1A	K89R	34
SAOM2A	G155I	46
SAOM3A	N166K	37
SAOM4A	M204A	51
SAOM5A	S213P	47
SAOM7A	N240Y	52
SAOM8A	E250Q	31
改変前 (control)	—	19

10 実施例 4 A 改変型ザルコシンオキシダーゼの評価 2

実施例 3 A で取得した変異型ザルコシンオキシダーゼ (SAOM1A、SAOM2A、SAOM5A、SAOM6A、SAOM7A、SAOM8A、SAOM9A) および比較例 1 で取得した各種ザルコシンオキシダーゼをそれぞれ、2 mM エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム、50 mM NaCl、0.1% (W/V) 2-メチルイソチアゾロン (ロッシュ・ダイアグノスティックス製)、0.1% (W/V) トリトン X-100 を含む PIPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5) 中に 5 U/ml になるように加え、40℃で3日間保存した後の残存酵素活性率 (%) を測定した。その結果を表 2 に示す。表 2 から判るように本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは改変前と比べて液状安定性が向上していることが確認された。

表 2

改変体	変異	活性残存率 (%)
SAOM1A	K89R	41
SAOM2A	C155I	47
SAOM5A	S213P	49
SAOM6A	G233S	72
SAOM7A	N240Y	73
SAOM8A	E250Q	40
SAOM9A	A364V	45
改変前 (control)	—	30

実施例 5 A 改変型ザルコシンオキシダーゼの評価 3

実施例 3 A で取得した変異型ザルコシンオキシダーゼ (SAOM1A、SAOM10A、SAOM11A、SAOM12A、SAOM13A) および比較例 1 で取得した各種ザルコシンオキシダーゼの、クレアチニン測定試薬中の安定性を測定した。1 mM エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム、50 mM 塩化ナトリウム、0.1% (W/V) 2-メチルイソチアゾロン (ロッシュ・ダイアグノスティックス製)、0.1% (W/V) トリトン X-100、0.02% (W/V) 4-アミノアンチピリン、0.02% (W/V) TOOS (同仁化学研究所製)、100 U/ml クレアチニンアミドヒドロラーゼ (東洋紡製; CNH-211)、50 U/ml クレアチンアミジノヒドロラーゼ (東洋紡製; CRH-221)、10 U/ml ペルオキシダーゼ (東洋紡製; PEO-301) を含む 50 mM PIPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5) に、上記のザルコシンオキシダーゼを 10 U/ml になるよう加え、35°C で 2 週間保存した後にザルコシンオキシダーゼ活性の残存率を測定した。その結果を表 3 に示す。表 3 から判るように本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは改変前と比べて、クレアチニン測定試薬中での液状安定性が向上していることが確認された。

表 3

改変体	変異	活性残存率 (%)
SAOM1A	K89R	28
SAOM10A	K89R, S213P	44
SAOM11A	K89R, S213P, E250Q	51
SAOM12A	K89R, C155I, N166K, S213P, E250Q, A364V	77
SAOM13A	K89R, M204A, S213P, G233S, N240Y, E250Q	79
改変前 (control)	—	16

実施例 6 A 改変型ザルコシンオキシダーゼの評価 4

実施例 3 A で取得した変異型ザルコシンオキシダーゼ (SAOM1A、SAOM10A、SAOM11A、SAOM12A、SAOM13A) および比較例 1 で取得した各種ザルコシンオキシダーゼの、クレアチン測定試薬中の安定性を測定した。1 mM エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム、50 mM 塩化ナトリウム、0.1% (W/V) 2-メチルイソチアゾロン (ロッシュ・ダイアグノスティックス製)、0.1% (W/V) トリトン X-100、0.02% (W/V) 4-アミノアンチピリン、0.02% (W/V) TOOS (同仁化学研究所製)、50 U/ml クレアチンアミジノヒドロラーゼ (東洋紡製; CRH-221)、10 U/ml ペルオキシダーゼ (東洋紡製; PEO-301) を含む 50 mM MP1PES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5) に、上記のザルコシンオキシダーゼを 10 U/ml になるよう加え、35℃で2週間保存した後にザルコシンオキシダーゼ活性の残存率を測定した。その結果を表 3 に示す。表 3 から判るように本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼは改変前と比べて、クレアチン測定試薬中での液状安定性が向上していることが確認された。

表 4

改変体	変異	活性残存率 (%)
SAOM1A	K89R	31
SAOM10A	K89R, S213P	44
SAOM11A	K89R, S213P, E250Q	52
SAOM12A	K89R, C155I, N166K, S213P, E250Q, A364V	80
SAOM13A	K89R, M204A, S213P, G233S, N240Y, E250Q	77
改変前 (control)	—	14

実施例 2 B 改変型ザルコシンオキシダーゼ遺伝子の作製

- ザルコシンオキシダーゼ遺伝子を含む発現プラスミド pSAOEP3 と、配列
- 5 番号 3 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE 製) を用いて、そのプロトコールに従って変異処理操作を行い、更に塩基配列を決定して、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 89 番目のリジンがアルギニンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド
- 10 (pSAOM1B) を取得した。
- pSAOEP3 と、配列番号 12 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE 製) を用いて、上記と同様の操作により、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 94 番目のバリンがグリシンに置換された変異
- 15 型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM2B) を取得した。
- pSAOEP3 と、配列番号 13 記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 322 番目のリジンがアルギニンに置換された変異型ザ
- 20 ルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM3B) を取得した。

pSAOM2Bと、配列番号10記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の94番目のバリンがグリシン、250番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM4B) を取得した。

pSAOM4Bと、配列番号3記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、94番目のバリンがグリシン、250番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM5B) を取得した。

pSAOM5Bと、配列番号7記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、94番目のバリンがグリシン、213番目のセリンがプロリン、250番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM6B) を取得した。

pSAOM6Bと、配列番号14記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、94番目のバリンがグリシン、204番目のメチオニンがアラニン、213番目のセリンがプロリン、250番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM7B) を取得した。

pSAOM7Bと、配列番号5記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、94番目のバリンがグリシン、166番目のアスパラギンがリジン、204番目のメチオニンがアラニン、213番目のセリンがプロリン、250番目のグルタミン酸がグルタミンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド (pSAOM8B) を取得した。

pSAOM8Bと、配列番号13記載の合成オリゴヌクレオチドおよびこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて、上記と同様の操作により、配列番号1記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがアルギニン、94番目のバリンがグリシン、166番目のアスパラギンがリジン、204番目のメチオニンがアラニン、213番目のセリンがプロリン、250番目のグルタミン酸がグルタミン、322番目のリジンがアルギニンに置換された変異型ザルコシンオキシダーゼをコードする組換えプラスミド(pSAOM9B)を取得した。

実施例3B 改変型ザルコシンオキシダーゼの作製

pSAOM1B、pSAOM2B、pSAOM3B、pSAOM4B、pSAOM5B、pSAOM6B、pSAOM7B、pSAOM8B、pSAOM9Bの各組み換えプラスミドでエシェリヒアコリーJM109のコンピテントセルを形質転換し、該形質転換体をそれぞれ取得した。

400mlのTerrific brothを2L容坂口フラスコに分注し、121℃、20分間オートクレーブを行い、放冷後別途無菌濾過したアンピシリンを100μl/mlになるように添加した。この培地に100μl/mlのアンピシリンを含むLB培地で予め30℃、16時間培養したエシェリヒアコリーJM109(pSAOM1)の培養液を5ml接種し、30℃で20時間通気攪拌培養した。培養終了時のザルコシンオキシダーゼ活性は、前記活性測定において、培養液1ml当たり約9.5U/mlであった。

上記菌体を遠心分離により集菌し、20mMリン酸緩衝液(pH7.5)に懸濁した後、超音波処理により破碎し、更に遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。得られた粗酵素液をポリエチレンジアミンによる除核酸および硫酸分画を行い、20mMリン酸緩衝液(pH7.5)で透析した後、DEAEセファロースCL-6B(アマシャムバイオサイエンス製)、更に熱処理により分離・精製し、精製酵素標品を得た。本方法により得られた標品は、SDS-PAGE的にほぼ単一なバンドを示した。また、この変異体をSAOM1Bと命名した。

pSAOM2B、pSAOM3B、pSAOM4B、pSAOM5B、pSAOM6B、pSAOM7B、pSAOM8B、pSAOM9Bの各組み換えプラスミドによるエシェリヒアコリーJM109形質転換体についても上記方法と同

様にして精製酵素標品を取得した。得られた酵素標品をそれぞれSAOM2B、SAOM3B、SAOM4B、SAOM5B、SAOM6B、SAOM7B、SAOM8B、SAOM9Bと命名した。

実施例4B 改変型ザルコシンオキシダーゼの評価

- 5 実施例3Bおよび比較例1で取得した各種ザルコシンオキシダーゼについて評価を実施した。

プロリン作用性は、上記活性測定法により、ザルコシンを基質とした際の酵素活性に対する、L-プロリンを基質とした際の酵素活性の相対比(%)より求めた。また、ザルコシンおよびL-プロリンに対する K_m 値は、上記活性測定法の

- 10 基質濃度を変化させて測定した。その結果を表5に示す。

表5から判るように、本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼのプロリンに対する反応性が、改変前に比べて低下していることが確認された。また、改変型ザルコシンオキシダーゼのザルコシンに対する K_m 値は、改変前のザルコシンオキシダーゼの K_m 値と比べてほぼ同程度、若しくは1.5倍以内であった。さらに、

- 15 改変型ザルコシンオキシダーゼは、プロリンに対する反応性が0.7%以下、若しくはL-プロリンに対する K_m 値は150mM以上の少なくともいずれか一方を特性を有することが示された。

表 5

改変体	変異	プロリン 作用性	Km 値(L-プ ロリン)	Km 値(ザ ルコシン)
SAOM1B	K89R	0.70%	151 mM	3.4 mM
SAOM2B	V94G	0.45%	214 mM	4.1 mM
SAOM3B	K322R	0.42%	122 mM	4.7 mM
SAOM4B	V94G, E250Q	0.58%	213 mM	3.4 mM
SAOM5B	V94G, E250Q, K89R	0.55%	198 mM	3.3 mM
SAOM6B	K89R, V94G, S213P, E250Q	0.54%	210 mM	3.5 mM
SAOM7B	K89R, V94G, M204A, S213P, E250Q	0.41%	203 mM	3.4 mM
SAOM8B	K89R, V94G, N166K, M204A, S213P, E250Q	0.41%	205 mM	3.4 mM
SAOM9B	K89R, V94G, N166K, M204A, S213P, E250Q, K322R	0.28%	202 mM	4.4 mM
改変前 (control)	—	0.85%	142 mM	3.4 mM

実施例 6 B クレアチニンの測定試薬におけるプロリンの影響

- 実施例 3 B および比較例 1 で取得した各種ザルコシンオキシダーゼを、クレアチニン測定試薬に適応した際のプロリンの影響度を評価した。10 U/ml ザルコシンオキシダーゼ（実施例 3 および比較例 1 で調整したもの）、1 mM エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム、50 mM 塩化ナトリウム、0.1% (W/V) トリトン X-100、0.02% (W/V) 4-アミノアンチピリン、0.02% (W/V) TOOS（同仁化学研究所製）、100 U/ml クレアチン
- 5 アミドヒドロラーゼ（東洋紡製；CNH-211）、50 U/ml クレアチンアミジノヒドロラーゼ（東洋紡製；CRH-221）、10 U/ml ペルオキシダーゼ（東洋紡製；PEO-301）を含む 50 mM PIPES-NaOH 緩衝液（pH 7.5）300 μ l に、5 mg/dl クレアチニン水溶液 10 μ l を加えて、37°C で 5 分間反応させ、546 nm の吸光度変化を HITA CH I 706
- 10 0 型自動分析装置を用いて測定した。また、クレアチニン水溶液の代わりに 100 mg/dl L-プロリン水溶液を用いて、上記と同様の操作で吸光度変化を測定した。プロリンの影響度は、クレアチニンを基質にした際に生じる反応 5 分間

の吸光度増加に対する、L-プロリンを基質にした際に生じる反応5分間の吸光度増加の相対比(%)より求めた。その結果を表6に示す。表6から判るように、本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼを、クレアチニン測定試薬に用いることで、該試薬のプロリンの影響度が低減していることが確認された。

5

表 6

改変体	変異	プロリン 影響度
SAOM1B	K89R	5.7%
SAOM2B	V94G	3.6%
SAOM3B	K322R	3.5%
SAOM4B	V94G, E250Q	3.8%
SAOM5B	V94G, E250Q, K89R	3.5%
SAOM6B	K89R, V94G, S213P, E250Q	3.4%
SAOM7B	K89R, V94G, M204A, S213P, E250Q	3.2%
SAOM8B	K89R, V94G, N166K, M204A, S213P, E250Q	3.3%
SAOM9B	K89R, V94G, N166K, M204A, S213P, E250Q, K322R	1.9%
改変前 (control)	—	7.2%

実施例 7 B クレアチンの測定試薬におけるプロリンの影響

実施例 3 B および比較例 1 で取得した各種ザルコシンオキシダーゼを、クレアチニン測定試薬に適応した際のプロリンの影響度を評価した。10 U/ml ザルコシンオキシダーゼ（実施例 3 および比較例 1 で調整したもの）、1 mM エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム、50 mM 塩化ナトリウム、0.1% (W/V) トリトン X-100、0.02% (W/V) 4-アミノアンチピリン、0.02% (W/V) TOOS（同仁化学研究所製）、50 U/ml クレアチンアミジノヒドロラーゼ（東洋紡製；CRH-221）、10 U/ml ペルオキシダーゼ（東洋紡製；PEO-301）を含む50 mM PIPES-NaOH 緩衝液（pH 7.5）300 μ l に、5 mg/dl クレアチン水溶液 10 μ l を加えて、37°C で5分間反応させ、546 nm の吸光度変化をHITACHI 7060型自動分析装置を用いて測定した。また、クレアチン水溶液の代わりに100 mg/dl L-プロリン水溶液を用いて、上記と同様の操作で吸光度変化を測定した。

プロリンの影響度は、クレアチンを基質にした際に生じる反応5分間の吸光度増加に対する、L-プロリンを基質にした際に生じる反応5分間の吸光度増加の相対比(%)より求めた。その結果を表7に示す。表7から判るように、本発明の改変型ザルコシンオキシダーゼを、クレアチン測定試薬に用いることで、該試薬5のプロリンの影響度が低減していることが確認された。

表7

改変体	変異	プロリン 影響度
SAOM1B	K89R	5.3%
SAOM2B	V94G	3.1%
SAOM3B	K322R	3.2%
SAOM4B	V94G, E250Q	3.0%
SAOM5B	V94G, E250Q, K89R	3.4%
SAOM6B	K89R, V94G, S213P, E250Q	3.1%
SAOM7B	K89R, V94G, M204A, S213P, E250Q	2.9%
SAOM8B	K89R, V94G, N166K, M204A, S213P, E250Q	3.1%
SAOM9B	K89R, V94G, N166K, 204A, S213P, E250Q, K322R	1.9%
改変前 (control)	—	7.0%

請求の範囲

1. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変換した蛋白質であって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有し、液状での安定性が変換前に比べて向上していることを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼ。
2. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換していることを特徴とする請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。
- 10 3. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列番号1に記載されるアミノ酸配列と50%以上の相同性を有する、請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。
4. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列番号1に記載されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有する、請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。
- 15 5. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有する、請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。
6. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の155位~250位間に対応する部位の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。
- 20 7. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の82位~92位、または、354位~366位間に対応する部位の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。
8. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の89位、155位、166位、25204位、213位、233位、240位、250位、364位に対応する部位からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。
9. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の89位のリジンがアルギニンに置換されていることを特徴とする請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

10. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の155位のシステインがイソロイシンに置換されていることを特徴とする請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

11. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の166位のアスパラギンがリジンに置換されていることを特徴とする請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

12. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の204位のメチオニンがアラニンに置換されていることを特徴とする請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

10 13. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の213位のセリンがプロリンに置換されていることを特徴とする請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

14. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の233位のシステインがセリンに置換されていることを特徴とする請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

15 15. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の240位のアスパラギンがチロシンに置換されていることを特徴とする請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

16. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の250位のグルタミン酸がグルタミンに置換されていることを特徴とする請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

17. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の364位のアラニンがバリンに置換されていることを特徴とする請求項1記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

25 18. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸を付加、欠失、挿入あるいは置換により変換した蛋白質であって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有し、且つL-プロリンに対する作用性が変換前に比べて低下していることを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼ。

19. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質を構成するアミノ酸配列の少なくとも1個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換していることを特徴とする請求項18記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

20. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列番号1に記載されるアミノ酸配列と50%以上の相同性を有する、請求項18記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

21. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列番号1に記載されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有する、請求項18記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

10 22. ザルコシンオキシダーゼ活性を有する蛋白質が、配列番号1に記載されるアミノ酸配列を有する、請求項18記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

23. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の82位~152位、216位~328位の間の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする請求項18記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

15 24. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の82位~97位、313位~328位の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする請求項18記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

25. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の89位、94位、322位からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることを特徴とする請求項18記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

26. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の89位のリジンがアルギニンに置換されていることを特徴とする請求項18記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

27. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の94位のバリンがグリシンに置換されていることを特徴とする請求項18記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

28. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の322位のリジンがアルギニンに置換されていることを特徴とする請求項18記載の改変型ザルコシンオキシダーゼ。

29. 改変後のザルコシンに対するKm値が、改変前に比べて3倍以内であることを特徴とする請求項18に記載されるザルコシンオキシダーゼ。

30. 改変後のザルコシンに対するKm値が、改変前に比べて1.5倍以内であることを特徴とする請求項18に記載されるザルコシンオキシダーゼ。

5 31. 37℃、pH8.0の測定条件下で、下記の少なくとも1種の特性を有することを特徴とするザルコシンオキシダーゼ。

 L-プロリンに対する作用性：ザルコシン対して0.7%以下

 L-プロリンに対するKm値：150mM以上

32. 37℃、pH8.0の測定条件下で、下記の少なくとも1種の特性を有
10 することを特徴とする請求項31に記載のザルコシンオキシダーゼ。

 L-プロリンに対する作用性：ザルコシン対して0.5%以下

 L-プロリンに対するKm値：200mM以上

33. ザルコシンに対するKm値が10mM以下である、請求項31記載のザルコシンオキシダーゼ。

15 34. ザルコシンに対するKm値が5mM以下である、請求項31記載のザルコシンオキシダーゼ。

35. 請求項1～17、18～30のいずれか1項に記載される改変型ザルコシンオキシダーゼをコードする遺伝子。

36. 請求項35に記載の遺伝子を含むベクター。

20 37. 請求項36に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

38. 請求項37に記載の形質転換体を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採取することを特徴とする改変型ザルコシンオキシダーゼの製造法。

39. 請求項31～34のいずれか1項に記載されるザルコシンオキシダーゼの生産能を有する微生物を培養し、該培養物からザルコシンオキシダーゼを採
25 取することを特徴とする基質特異性に優れたザルコシンオキシダーゼの製造法

40. 請求項1～17、18～30、31～34のいずれか1項に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチン測定用試薬。

41. 請求項1～17、18～30、31～34のいずれか1項に記載されるザルコシンオキシダーゼを含むクレアチニン測定用試薬。

1/11

SEQUENCE LISTING

<110> Toyo Boseki Kabushiki Kaisha

<120> Altered Sarcosine Oxidase, Method for preparing the same and Reagent
Composition using the same

<130> P03-128

<150> JP2002-329428

<151> 2002-11-13

<150> JP2003-33641

<151> 2003-02-12

<150> JP2002-329427

<151> 2002-11-13

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 389

<212> PRT

<213> Arthrobacter SP. TE1826

<400> 1

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser

1

5

10

15

Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr

20

25

30

2/11

Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His
35 40 45

Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr
50 55 60

Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
65 70 75 80

Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
85 90 95

Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
100 105 110

Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys
115 120 125

Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu
130 135 140

Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg
145 150 155 160

Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val
165 170 175

3/11

Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr

180

185

190

Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn

195

200

205

Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr

210

215

220

Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn

225

230

235

240

Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr

245

250

255

Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His

260

265

270

Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly

275

280

285

Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr

290

295

300

Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr

305

310

315

320

4/11

Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe
 325 330 335

Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
 340 345 350

Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
 355 360 365

Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
 370 375 380

Gln Lys Glu Thr Ile
 385

<210> 2

<211> 1167

<212> DNA

<213> Arthrobacter SP. TE1826

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1167)

<223>

<400> 2

atg agt att aaa aaa gat tat gat gta att gtg gtt ggc gct ggt tcc 48

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser

1

5

10

15

5/11

atg gga atg gca gct ggg tac tat ctg tct aaa caa ggt gtt aaa aca	96
Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr	
20 25 30	
cta ttg gta gat tca ttt cat cct ccc cat aca aat ggc agc cat cat	144
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His	
35 40 45	
ggc gat aca cgg atc att cgt cac gca tat ggc gaa gga aga gag tat	192
Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr	
50 55 60	
gta ccg ttt gcc ttg aga gca caa gag tta tgg tat gaa tta gaa aag	240
Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys	
65 70 75 80	
gag act cat cat aaa ata ttt aca aaa aca ggt gta ctc gtt ttt ggt	288
Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly	
85 90 95	
cct aaa gga gaa gct cct ttc gtt gcc gaa aca atg gaa gcc gca aag	336
Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys	
100 105 110	
gaa cat tca tta gat gtt gat tta cta gaa gga agt gaa ata aat aag	384
Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys	
115 120 125	
cgt tgg cca ggt gta acg gtt cct gag aat tat aat gct att ttt gaa	432
Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu	
130 135 140	
aaa aat tct ggt gtc tta ttt agt gaa aat tgt att cgc gct tac cgt	480
Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg	
145 150 155 160	

6/11

gaa ttg gcg gaa gca aat ggt gcg aaa gtt cta acg tac aca ccc gtt	528
Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val	
165 170 175	
gaa gat ttc gag att gcc gag gac ttc gtc aaa atc caa acc gcc tat	576
Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr	
180 185 190	
ggc tcc ttt aca gcc agt aaa tta att gtt agc atg ggc gct tgg aat	624
Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn	
195 200 205	
agc aaa ctg cta tca aaa tta aat att gaa atc cca ttg cag cca tac	672
Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr	
210 215 220	
cgt caa gtt gtc gga ttc ttc gaa tgt gat gaa aaa aaa tat agc aat	720
Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn	
225 230 235 240	
aca cat ggt tat ccg gcg ttc atg gtc gaa gtc cca act ggc atc tat	768
Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr	
245 250 255	
tac gga ttt cca agc ttc ggc ggc tgc ggc ttg aaa ata ggc tat cat	816
Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His	
260 265 270	
acg tat ggt caa aaa atc gat cca gat acg att aat cgt gaa ttt ggt	864
Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly	
275 280 285	
att tac ccg gag gat gaa ggg aat att cgc aaa ttc ctg gaa aca tat	912
Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr	
290 295 300	

7/11

atg ccg gga gca acc ggc gaa tta aaa agt ggg gca gtt tgc atg tac 960
Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
305 310 315 320

aca aaa aca cct gat gag cat ttc gtg att gat tta cat cct caa ttc 1008
Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe
325 330 335

tcg aat gtc gcg att gca gcc gga ttc tcc gga cat ggg ttt aaa ttc 1056
Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
340 345 350

tca agc gta gtt ggt gaa aca tta agt caa tta gct gta acc ggt aaa 1104
Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
355 360 365

aca gaa cac gat att tcc atc ttt tca atc aat cgc cct gct tta aaa 1152
Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
370 375 380

caa aaa gaa acg att 1167
Gln Lys Glu Thr Ile
385

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arthrobacter SP. TE1826

<400> 3

gactcatcat aaaatattta caagaacagg tgtactcg

38

8/11

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arthrobacter SP. TE1826

<400> 4

gtgtcttatt tagtgaaaat attattcgcg cttacc

36

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arthrobacter SP. TE1826

<400> 5

gaattggcgg aagcaaaagg tgcgaaagtt ctaacg

36

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arthrobacter SP. TE1826

<400> 6

gccagtaaatt taattgttag cgcgggcgct tggaatag

38

9/11

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arthrobacter SP. TE1826

<400> 7

gaatagcaaa ctgctaccaa aattaaatat tgaaatcc

38

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arthrobacter SP. TE1826

<400> 8

gtcggattct tcgaaagcga tgaaaaaaaa tatagc

36

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arthrobacter SP. TE1826

<400> 9

gtgatgaaaa aaaatatagc tatacacatg gttatccg

38

10/11

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arthrobacter SP. TE1826

<400> 10

ccggcgtca tggccaggt cccaactggc atc

33

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arthrobacter SP. TE1826

<400> 11

gaaacattaa gtcaattagt tgtaaccggt aaaacag

37

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arthrobacter SP. TE1826

<400> 12

caaaaacagg tgtactcggg ttggtccta aaggag

36

11/11

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arthrobacter SP. TE1826

<400> 13

gtttgcatgt acacaagaac acctgatgag catttcg

37

<210> 14

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Arthrobacter SP. TE1826

<400> 14

ccagtaaatt aattgtagc gcgggcgctt ggaatag

37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14423

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/02, C12N15/53, C12Q1/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/02, C12N15/53, C12Q1/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Registry (STN), WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 7-163341 A (Toyobo Co., Ltd.), 27 June, 1995 (27.06.95), Claim 1; Par. Nos. [0029], [0035] (Family: none)	<u>1-5, 35-38,</u> <u>40, 41</u> 6-34, 39
<u>X</u> A	JP 10-248572 A (Toyobo Co., Ltd.), 22 September, 1998 (22.09.98), Claim 1; Par. No. [0038] (Family: none)	<u>18-22, 29,</u> <u>31-41</u> 1-17, 23-28, 30
A	JP 7-170976 A (Toyobo Co., Ltd.), 11 July, 1995 (11.07.95), (Family: none)	1-41

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 February, 2004 (05.02.04)

Date of mailing of the international search report
17 February, 2004 (17.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14423

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-120273 A (Toyobo Co., Ltd.), 08 May, 2001 (08.05.01), (Family: none)	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14423

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to the inventions according to claims 1 to 17 and 18 to 30 resides exclusively in being a modified sarcosine oxidase.

However, it is publicly known to produce a modified sarcosine oxidase, as reported in JP 7-163341 A and JP 10-248572 A. Thus, the above matter is not a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2. There is no other common matter seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2 among the modified sarcosine oxidases according to claims 11 to 17 and 18 to 30.

(Continued to extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14423

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The same applies to the inventions according to claims 1 to 17 and 31 to 34.

The matter common to the inventions according to claims 18 to 30 and 31 to 34 resides exclusively in being a modified sarcosine oxidase with a lowered action on L-proline.

However, it is publicly known to produce a modified sarcosine oxidase with a lowered action on L-proline, as reported in JP 10-248572 A. Thus, the above matter is not a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2. There is no other common matter seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2 among the modified sarcosine oxidases according to claims 18 to 30 and 31 to 34.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N9/02, C12N15/53, C12Q1/26		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N9/02, C12N15/53, C12Q1/26		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
Registry (STN) WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP 7-163341 A (東洋紡績株式会社) 1995. 06. 27, 請求項 1, [0029] 欄, [0035] 欄等 (ファミリーなし)	1-5, 35-38, 40, 41 6-34, 39
X A	JP 10-248572 A (東洋紡績株式会社) 1998. 09. 22, 請求項 1, [0038] 欄等 (ファミリーなし)	18-22, 29, 31- 41 1-17, 23-28, 30
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 05. 02. 2004		国際調査報告の発送日 17. 2. 2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 深草 亜子 4 B 9548 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 7-170976 A (東洋紡績株式会社) 1995.07.11, (ファミリーなし)	1-41
A	JP 2001-120273 A (東洋紡績株式会社) 2001.05.08, (ファミリーなし)	1-41

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

クレーム1-17、18-30に記載された発明は、改変型ザルコオキシダーゼであるという点においてのみ共通する。

しかしながら、改変型ザルコオキシダーゼを作製することは、特開平7-163341号公報や特開平10-248572号公報に記載されているように公知の事項であるから、当該事項はPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴ではない。そして、クレーム11-17、18-30に記載された改変型ザルコオキシダーゼの間には、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しない。

クレーム1-17、31-34に記載された発明についても同様である。
(特別ページに続く)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第II欄 続き

クレーム18-30、31-34に記載された発明は、L-プロリンに対する作用性が低下した改変型ザルコオキシダーゼであるという点においてのみ共通する。

しかしながら、L-プロリンに対する作用性が低下した改変型ザルコオキシダーゼを作製することは、特開平10-248572号公報に記載されているように公知の事項であるから、当該事項はPCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴ではない。そして、クレーム18-30、31-34に記載された改変型ザルコオキシダーゼの間には、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しない。